

10/517778

DT01 Rec'd PCT/PTC 27 DEC 2004

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Tetsuo IKEZONO et al.
Appl. No: : Not Yet Assigned PCT Branch
Filed : Concurrently Herewith PCT/JP2003/008123
For : METHOD FOR DETECTING PERILYMPH FISTULAS

CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Japanese Application No. 2002-187479, filed June 27, 2002. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
Tetsuo IKEZONO et al.



Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027

Leslie J. Paperner
Reg. No. 33,329

December 27, 2004
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

PCT/JP 03/08123

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

26.06.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 6 月 2 7 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 1 8 7 4 7 9
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 1 8 7 4 7 9]

REC'D 15 AUG 2003

WIPO PCT

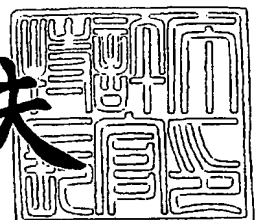
出 願 人
Applicant(s): 学校法人日本医科大学
三菱化学株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 7 月 3 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A21400A

【提出日】 平成14年 6月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N

【発明の名称】 外リンパ瘻の検出方法

【請求項の数】 10

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都文京区千駄木1丁目1番5号 日本医科大学内

 【氏名】 池園 哲郎

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都文京区千駄木1丁目1番5号 日本医科大学内

 【氏名】 八木 聰明

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化学生命科学
 研究所内

 【氏名】 大森 彬

【特許出願人】

 【識別番号】 500557048

 【氏名又は名称】 学校法人日本医科大学

【特許出願人】

 【識別番号】 000005968

 【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】

 【識別番号】 110000109

 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

 【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 外リンパ瘻の検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 中耳に存在する体液中のCochlinの存在を検出することを含む、外リンパ瘻の検出方法。

【請求項2】 外リンパ瘻に罹患していることが疑われる患者の中耳に存在する体液中のCochlinの存在を検出し、検出されたCochlinの存在を外リンパ瘻の可能性の指標とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 Cochlinの存在の検出が、CochlinのN末端フラグメントよりなる蛋白質の存在を検出することにより行われる、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 Cochlinの存在の検出が、免疫学的方法により行われる、請求項1から3の何れかに記載の方法。

【請求項5】 免疫学的方法が、配列表の配列番号：2に記載のアミノ酸配列で表されるポリペプチドに含まれる抗原決定基を認識することを特徴とする抗Cochlin N末端フラグメント抗体を用いて行われる、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 配列表の配列番号：2に記載のアミノ酸配列で表されるポリペプチドに含まれる抗原決定基を認識することを特徴とする抗Cochlin N末端フラグメント抗体。

【請求項7】 抗Cochlin抗体から成る外リンパ瘻検出用試薬。

【請求項8】 抗Cochlin抗体が抗Cochlin N末端フラグメント抗体である、請求項7に記載の外リンパ瘻検出用試薬。

【請求項9】 抗Cochlin抗体が配列表の配列番号：2に記載のアミノ酸配列で表されるポリペプチドに含まれる抗原決定基を認識することを特徴とする抗Cochlin N末端フラグメント抗体である、請求項7又は8に記載の外リンパ瘻検出用試薬。

【請求項10】 請求項7から9の何れかに記載の外リンパ瘻検出用試薬を含む、外リンパ瘻検出用試薬キット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は外リンパ瘻の検出方法、それに用いる抗体、試薬、及びキットに関する。

【0002】**【従来の技術】**

外リンパ瘻 (Perilymph fistula) は、内耳組織に存在する外リンパが内耳窓 (正円窓、卵円窓のいずれか又は両者) あるいはfissura ante fenestram (内耳と中耳の間の骨裂隙) から鼓室内 (中耳) に漏出して聴覚・平衡感覚の障害を生じる疾患であり、発生原因としては、先天性奇形、梅毒、あぶみ骨手術、頭部外傷 (圧外傷を含む)、特発性 (原因不明) 等が考えられている。例えば、鼻かみ、くしゃみ、咳、力み、潜水、登山、外傷等のような、日常生活において通常行われ得る行動によって生じる髄液圧や内耳圧の急激な変化によっても引き起こされることが知られており、急性感音難聴や、めまい・平衡障害の一部を占める疾患となっている。

【0003】

しかしこの外リンパ瘻の診断は、従来、診断基準 (浅野ら、耳展、34,4,411-425 (1991)) に従って生理学的所見、症状、病歴等を総合的に検証する方法により行われているために不確定な場合が多く、また、確定診断として選択される鼓室開放術は患者への侵襲度が問題となっていた。さらには、鼓室開放術を行っても目視により外リンパの漏出が確認できず、確定診断がなされないケースも多数存在していた。

【0004】

一方、突発性難聴とは、急性感音難聴のうち原因を明確に特定できないものであって、急性感音難聴の中で最も高い割合を占めている疾患である。しかし、この突発性難聴の患者に試験的鼓室開放術を行った結果、11例中8例に外リンパ瘻が認められたことが報告されている (「突発感音難聴における内耳窓膜破たんに関する臨床的並びに実験的研究」、吉岡邦英、耳鼻咽喉科展望、VOL.26, Supp

1.6, 517-539(1983))。また、急性感音難聴の一つであり、現代社会において増加傾向にある症候群として知られるメニエール病の中にも、かねてより外リンパ瘻患者が含まれていることが示されている。実際に多数のメニエール病患者を解析した結果を元にメニエール病と診断された患者の中にも外リンパ瘻患者が含まれていることを示し、鑑別診断の必要性について述べた報告もある (D.C.Fitzgerald, Ann.Otol.Rhinol.Laryngol., 110, 430-436(2001))。これらのことは、前記診断基準に合致しない症例の中にも外リンパ瘻が含まれていることを示している。しかし、外リンパ瘻の確定診断の方法が確立されていないことから、臨床現場においては未だ実質的な鑑別は難しいのが実状であり、これらの問題は解決されていない。外リンパ瘻は、急性感音難聴の中でも手術により聴覚・平衡覚障害の改善が期待できる唯一の疾患である上、迅速な治療が治癒率を左右することから、簡便、確実で、かつ患者への侵襲度の低い診断方法の開発が強く望まれている。

【0005】

今日までに、外リンパ瘻の診断に用い得るマーカーを探索してApoD及びApoJを指標として用いることを提案した報告 (Thalmann et al., Otolaryngology - Head and Neck Surgery, 111,3,1,273-280(1994))、GM1 (monosialoganglioside 1) を指標にして外リンパ瘻診断を試みた報告 (「GM1を用いた外リンパ瘻診断の試み」、神崎仁、井上康宏、小川郁、熊埜御堂浩、松延毅、厚生労働省特定疾患対策研究事業・急性高度感音難聴に関する調査研究班・平成11年度報告書、P. 41-43(2000))、Prostaglandin D synthaseを指標として用いることを提案した報告 (G.Bachmann, et al., J.Laryngol.otol., 115, 132-135(2001))、Transferrinを指標にして外リンパ瘻診断を試みた報告 (Rauch S.D., Laryngoscope, 110(4),545-52(2000)) 等があるものの、いずれも臨床的に用い得るようなものではなかった。

【0006】

一方、COCHは、非症候性遺伝性難聴DFNA9の原因遺伝子として同定された遺伝子であり、該遺伝子によりコードされるCOCH蛋白質はCochlinと命名されている (N.G.Robertson, Nature Genet., 20,299-303(1998); NCBI OMIM ホームページ

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>))。

【0007】

本発明者らは、このCochlinがヒトの難聴において重要な蛋白質であることに着目してウシ内耳組織におけるCochlinのプロテオーム解析を行い、Cochlinが3つの異なるN末端を持ち、それぞれ63kDa、44kDa、及び40kDaの分子量を有する3種類のアイソフォームp63、p44、及びp40として存在していることを明らかにしている。また、N末端にはLCCL (Trexler et al., Eur.J.Biochem., 267, 5751-5757(2000)) と呼ばれるモジュールがあり、これまでに見つかっているDFNA9に関わる突然変異は全てこのモジュール内に存在し、かつアイソフォームp63のみに含まれており、他のアイソフォームには存在しないこと等を報告している (Ikezo et al., Biochem.Biophys.Acta, 1535, 3, 258-265(2001))。しかし、上記の報告はウシ内耳組織の二次元ゲル電気泳動法 (2D-GE) によるプロテオーム解析を行ったものにすぎず、Cochlinの臨床的意義等については十分な検討がなされていないかった。

【0008】

また、N.G.Robertsonらは、Cochlinに対する抗体を作製して内耳組織の免疫組織染色等を行い、内耳組織におけるCochlinの発現について解析している (Hum.Mol.Genet., 10, 22, 2493-2500(2001))。しかし、この報告も、内耳組織における蛋白質の局在化等の解析を行っているにすぎず、外リンパ中のCochlinの存在についての知見はなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、簡便、確実で、かつ患者への侵襲度の低い外リンパ瘻の検出方法を提供することを解決すべき課題とした。本発明はさらに、上記した本発明の検出方法で用いるための抗体、試薬およびキットを提供することを解決すべき課題とした。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を達成するために鋭意検討を進めた結果、外リンパ瘻

に罹患していることが疑われる患者の中耳に存在する体液を試料とし、該試料中のCochlinの存在を指標にすることにより外リンパ瘻が検出できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

【0011】

すなわち本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) 中耳に存在する体液中のCochlinの存在を検出することを含む、外リンパ瘻の検出方法。

(2) 外リンパ瘻に罹患していることが疑われる患者の中耳に存在する体液中のCochlinの存在を検出し、検出されたCochlinの存在を外リンパ瘻の可能性の指標とする、(1)に記載の方法。

【0012】

(3) Cochlinの存在の検出が、CochlinのN末端フラグメントよりなる蛋白質の存在を検出することにより行われる、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) Cochlinの存在の検出が、免疫学的方法により行われる、(1)から(3)の何れかに記載の方法。

(5) 免疫学的方法が、配列表の配列番号：2に記載のアミノ酸配列で表されるポリペプチドに含まれる抗原決定基を認識することを特徴とする抗Cochlin N末端フラグメント抗体を用いて行われる、(4)に記載の方法。

【0013】

(6) 配列表の配列番号：2に記載のアミノ酸配列で表されるポリペプチドに含まれる抗原決定基を認識することを特徴とする抗Cochlin N末端フラグメント抗体。

(7) 抗Cochlin抗体から成る外リンパ瘻検出用試薬。

(8) 抗Cochlin抗体が抗Cochlin N末端フラグメント抗体である、(7)に記載の外リンパ瘻検出用試薬。

(9) 抗Cochlin抗体が配列表の配列番号：2に記載のアミノ酸配列で表されるポリペプチドに含まれる抗原決定基を認識することを特徴とする抗Cochlin N末端フラグメント抗体である、(7)又は(8)に記載の外リン

パ瘻検出用試薬。

(10) (7) から (9) の何れかに記載の外リンパ瘻検出用試薬を含む、外リンパ瘻検出用試薬キット。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について更に詳細に説明する。

本明細書において、蛋白質の精製及び解析、並びに抗体の作製等の手法は、特に明記しない限り、新生化学実験講座（日本生化学会編；東京化学同人）、Antibodies - A Laboratory Manual (E. Harlow, et al., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)) 等の一般的実験書に記載の方法又はそれに準じて行うことができる。

【0015】

1. 外リンパ瘻の検出方法

本発明において、外リンパ瘻 (Perilymph fistula) とは、内耳組織に存在する外リンパが何らかの要因により内耳窓（正円窓、卵円窓のいずれか又は両者）あるいは *fissura ante fenestram*（内耳と中耳の間の骨裂隙）から鼓室内（中耳）に漏出して聴覚・平衡感覚の障害を生じる疾患である。該疾患は、外リンパが中耳へ漏出していることを確認することにより検出することができる。本発明の外リンパ瘻の検出方法は、該疾患に罹患していることが疑われる患者の中耳に存在し得る体液のうち、外リンパのみに存在する Cochlin の存在を検出して、該患者が外リンパ瘻に罹患している可能性の指標とすることを特徴とする方法である。本法によれば、外リンパ瘻発症の要因や機構によらず検出を行うことができる。

【0016】

Cochlin とは、非症候性遺伝性難聴 DFNA9 の原因遺伝子として同定された遺伝子 COCH によりコードされる蛋白質である (N. G. Robertson, Nature Genet., 20, 299-303 (1998))。該蛋白質は、ヒト、ウシ、モルモット、ラット等の動物種において、3つの異なる N 末端を持ち、63kDa、44kDa、及び 40kDa の分子量を有する 3 種類のアイソフォーム p63、p44、p40 として存在する (Ikezono et al., Biochem. Bio

phys. Acta, 1535, 3, 258-265 (2001))。本明細書において配列表の配列番号：1 に示す Cochlin のアミノ酸配列は、Nature Genet., 20, 299-303 (1998) に記載されているヒト Cochlin のアミノ酸配列であり、本明細書中でのアミノ酸番号は該配列におけるアミノ酸番号を用いる。例えば、ヒトにおいて最も大きな 63kDa の分子量を有するアイソフォーム p63 とは、該アミノ酸配列におけるアミノ酸番号 25～550 で表されるアミノ酸配列よりなる蛋白質である。アイソフォーム p44 とは該アミノ酸配列におけるアミノ酸番号 133～550 で表されるアミノ酸配列よりなる蛋白質であり、アイソフォーム p40 とはアミノ酸番号 152～550 で表されるアミノ酸配列よりなる蛋白質である。また、該アミノ酸配列においてアミノ酸番号 1～24 で表される部分はシグナル配列である。

【0017】

本発明において、外リンパ瘻の可能性の指標として用いられる Cochlin とは、外リンパ中に存在し、配列表の配列番号：1 に記載のアミノ酸配列又はその部分配列を有する蛋白質であればいかなるものでもよい。該蛋白質は、ヒトの中耳に存在し得る他の体液中には実質的に存在せず、外リンパのみに存在するものである。具体的には、例えば、アイソフォーム p63 でもよいし、アイソフォーム p44 もしくは p40 でもよく、それらのフラグメントよりなる蛋白質等でもよいが、その中でも、アイソフォーム p63 の N 末端のアミノ酸配列を含むフラグメント（以下、これを「N 末端フラグメント」と称することがある）よりなる蛋白質が好ましく用いられる。該フラグメントとしては、Cochlin のアイソフォーム p63 の N 末端のアミノ酸配列を含むものであればいかなる大きさを有する蛋白質でもよいが、後述する配列番号：2 に記載のアミノ酸配列で表されるポリペプチドに含まれる抗原決定基を認識することを特徴とする抗体等により認識される約 16kDa の分子量を有する N 末端フラグメントが特に好ましい。本明細書中では、このような蛋白質を以下、単に「Cochlin」と称することがある。

【0018】

本発明の検出方法に供せられる試料としては、外リンパ瘻に罹患していることが疑われる患者の中耳に存在する体液が用いられる。ヒトの中耳内に存在し得る体液としては、例えば、外リンパ、脳脊髄液 (Cerebro-Spinal Fluid; 以下、こ

れを「CSF」と称することがある）、血液、唾液、中耳粘膜より産生される中耳粘液等が挙げられる。例えば、CSFは、手術等により内耳道の第8脳神経の経路もしくは蝸牛小管を通して内耳に流入したものが中耳へ流入したり、外傷、骨折、内耳の奇形等によっても流入することが知られている。血液は、外傷による出血、中耳粘膜からの出血等により中耳に存在し得る。唾液は、上咽頭に存在するものが耳管から逆流することにより中耳に流入することが知られている。また、滲出性中耳炎患者では中耳滲出液、慢性中耳炎患者では耳漏（膿）等も存在し得る。これらの体液を目視により判別することはできないが、これらを採取して解析を行い、該試料中のCochlinの存在を解析することにより、試料として採取された体液が外リンパであるか否かを判別することができ、外リンパ瘻の可能性の指標とすることができる。

【0019】

中耳内に存在する体液の採取方法としては、できるだけ血液、薬剤等を混入させず、また、他の蛋白質等を混入させずに採取できる方法であって、患者への侵襲度の低い方法であればいかなる方法でもよい。例えば、鼓膜を微小に切開し、シリンジ等を挿入してそのまま該体液を吸引して採取してもよいし、綿棒等を挿入して存在する体液をぬぐい取ることにより採取してもよい。採取されるべき体液が極微量である場合には、シリンジ等を用いて生理食塩水等の適当な溶液を適量注入した後、該溶液ごとシリンジ等で回収する方法が好ましく用いられる。本発明においては、このような方法により回収された溶液を「中耳洗浄液」と称する。ここで用いられる溶液としては、組成、pH、温度等において生理学的に許容され、患者に与える負担の少ない溶液が選択される。また、中耳は耳管を經由して上咽頭、中咽頭と通じていることから、耳管を通じて上咽頭、中咽頭に達した中耳由来の体液を採取してもよい。具体的には、例えば、口腔又は鼻腔から綿棒等を挿入し、上咽頭もしくは中咽頭に存在する体液をぬぐい取ることにより採取することができる。

【0020】

かくして採取された体液は、採取後、直ちに解析に供されることが好ましいが、 $4 \sim -80^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-20 \sim -70^{\circ}\text{C}$ 等の低温条件下で保存しておくこ

ともできる。保存に際しては、必要に応じて蛋白質の変性等を抑制するような保存剤や、腐敗を防止するための防腐剤等を添加してもよい。また、これらの試料は、必要に応じて濃縮、精製等の前処理を行ってから解析に供してもよい。これらの具体的手法は、それ自体公知の通常用いられる蛋白質の濃縮、精製等の手法を用いればよい。

【0021】

上記したような方法により採取された外リンパ瘻に罹患していることが疑われる患者の中耳に存在する体液において、Cochlinの存在を検出するための方法としては、公知の蛋白質の検出・解析方法であればいかなる方法でも用いることができる。具体的には、Cochlinの存在の検出は、免疫学的方法で行ってもよいし、非免疫学的方法（液体クロマトグラフィー、二次元電気泳動、質量分析、及びこれらの組み合わせ等）で行ってもよい。これらの中でも、本発明においては、前記Cochlin又はその部分ポリペプチドを認識する抗体（以下、これを「抗Cochlin抗体」と称することがある）を用いた免疫学的方法を用いることが好ましい。免疫学的に蛋白質の検出を行う方法としては、例えば、ウエスタンブロッティング法、酵素免疫測定法（ELISA法）、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、放射免疫測定法、ラテックス凝集法、免疫比濁法、免疫クロマトグラフィー法等のそれ自体公知の通常用いられる方法であればいかなる方法でも用い得るが、この中でも、ウエスタンブロッティング法、ELISA法等が好ましく用いられる。

【0022】

本発明の検出方法を、酵素免疫測定法（ELISA法）、化学発光免疫測定法、蛍光抗体法、又は放射免疫測定法等の標識抗体を用いた免疫測定法により実施する場合には、サンドイッチ法又は競合法により行うこともできる。サンドイッチ法の場合には固相化抗体及び標識抗体のうち少なくとも1種が、抗Cochlin抗体であればよい。

【0023】

サンドイッチ法で用いる固相担体としては、抗体を担持させるのに使用できる不溶性担体であればよく、例えば、（1）ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂あるいはナイロン樹脂等からなるプラスチックや、ガラス等

に代表されるような水に不溶性の物質からなるプレート、試験管若しくはチューブ等の内容積を有するもの、ビーズ、ボール、フィルター、あるいはメンブレン等、並びに(2)セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のようなアフィニティークロマトグラフィーに用いられる不溶性担体を挙げることができる。

【0024】

測定の方法は公知の方法(例えば、日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」, 臨床病理刊行会, 1983年, 石川榮治ら編「酵素免疫測定法」, 第3版, 医学書院, 1987年, 北川常廣ら編「蛋白質核酸酵素別冊No. 31 酵素免疫測定法」, 共立出版, 1987年)に準じて行うことができる。

【0025】

例えば、固相化抗体と試料を反応させ、同時に標識抗体を反応させるか、又は洗浄の後に標識抗体を反応させて、固相化抗体-抗原-標識抗体の複合体を形成させる。そして未結合の標識抗体を洗浄分離して、結合標識抗体の量より試料中の抗原量を測定することができる。具体的には、酵素免疫測定法(ELISA法)の場合は標識酵素にその至適条件下で基質を反応させ、その反応生成物の量を光学的方法等により測定する。蛍光免疫測定法の場合には蛍光物質標識による蛍光強度を、放射免疫測定法の場合には放射性物質標識による放射線量を測定する。化学発光免疫測定法の場合は発光反応系による発光量を測定する。

【0026】

本発明の検出方法を、ラテックス凝集反応、又は免疫比濁法等の場合のように免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、目視的に測る測定法により実施する場合には、溶媒としてリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液又はグッド緩衝液等を用いることができ、更にポリエチレングリコール等の反応促進剤や非特異的反応抑制剤を含ませてもよい。

【0027】

抗体を固相担体に担持させて用いる場合には、固相担体としては、ポリスチレ

ン、スチレンーブタジエン共重合体、(メタ)アクリル酸エステル類ポリマー、ラテックス、ゼラチン、リポソーム、マイクロカプセル、赤血球、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子を使用することができる。

【0028】

この担持の方法としては、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの方法の併用等の公知の方法を使うことができる。測定の方法は公知の方法により行うことができるが、例えば、光学的方法により測定する場合には、試料と抗体、又は試料と固相担体に担持させた抗体を反応させ、エンドポイント法又はレート法により、透過光や散乱光を測定する。

【0029】

また、目視的に測定する場合には、プレートやマイクロタイタープレート等の容器中で、試料と固相担体に担持させた抗体を反応させ、凝集の状態を目視的に判定する。なお、目視的に測定する代わりにマイクロプレートリーダー等の機器を用いて測定を行ってもよい。

【0030】

上記した方法を用いて患者の中耳内に存在する体液を試料とした解析を行い、該試料中にCochlinの存在が検出された場合に、該患者が外リンパ瘻に罹患している可能性があるとは判定することができる。また、それ自体公知の通常用いられる蛋白質の定量法によって定量を行い、該体液におけるCochlinの存在量を求めることもできる。

【0031】

2. Cochlinを検出するための抗体及びそれを用いた試薬

上記したような免疫学的方法において用いられる抗体としては、前記Cochlinを認識するものであればいかなるものでも用い得る。即ち、本発明によれば、抗Cochlin抗体から成る外リンパ瘻検出用試薬が提供される。

抗Cochlin抗体は、例えば、配列表の配列番号: 1に記載のアミノ酸配列又はその部分配列を有するポリペプチド(以下、これを「抗原ポリペプチド」と称することがある)を抗原として作製することができる。具体的には、例えば

、前記N末端フラグメントよりなる蛋白質に特異的なアミノ酸配列を有する抗原ポリペプチドに含まれる抗原決定基（以下、これを「エピトープ」と称することがある）を認識する抗体（以下、これを「抗Cochlin N末端フラグメント抗体」と称することがある）等が好ましく用いられる。さらには、抗Cochlin N末端フラグメント抗体の中でも、約16kDaの分子量を有するN末端フラグメントよりなる蛋白質に特異的な抗原ポリペプチドに含まれる抗原決定基を認識する抗体が特に好ましく用いられる。

【0032】

このような本発明の抗体は、ヒトの中耳に存在し得る外リンパ以外の体液中に含まれる他の蛋白質等と反応しない抗体であることが好ましいが、Cochlinとの反応性が十分に高く、外リンパと他の体液とを区別し得るものであれば用いることができる。具体的には、例えば、ウエスタンブロッティング法を用いて検出を行う場合には、該抗体により検出されるバンドの位置等により、Cochlin由来のバンドと他の蛋白質由来のバンドとが明確に区別できるものであればよい。

【0033】

抗原ポリペプチドとしては、それ自体公知の方法に従って抗原性が高く抗原決定基として適した配列を選択して用いればよい。例えば、「Epitope Adviser」

（富士通九州システムエンジニアリング社製）等の市販のエピトープ解析ソフトを用いてCochlinのアミノ酸配列を解析し、立体構造上露出していること、疎水性及び親水性、構造の柔軟性、極性等を総合的に予測してエピトープとなり易い形状を有していると推定された配列を選択することができる。また、例えば、多くの動物種において反応する抗体を作製する場合には、目的の複数の動物種が有するCochlinのアミノ酸配列を適当な配列解析ソフト等でアライメントし、各動物種に共通のアミノ酸配列の中から、エピトープとなり易い部分配列を選択すればよい。また、ある特定の動物種に特異的に結合する抗体を作製する場合には、他の動物種が有するCochlinのアミノ酸配列とのホモロジーが低い部分を選択すればよい。

【0034】

また、抗原ポリペプチドの長さは、後述するような方法に従って該ポリペプチ

ドを用いて免疫を行った際に、免疫された動物において抗原として認識され得るような長さを有していればいかなる長さでもよい。具体的には、例えば、アミノ酸5～30残基、好ましくは10～25残基の長さのもの等が用いられる。このような抗原ポリペプチドは、公知の方法に従って化学的に合成された合成ポリペプチドでも、天然物から抽出・精製したものでもよい。

【0035】

かくして選択される抗原ポリペプチドとしては、配列表の配列番号：1に記載のアミノ酸配列又はその部分配列を有するポリペプチドの中から、外リンパに存在するCochlinが有するアミノ酸配列を含むものであれば任意に選択して用いることができる。具体例として、例えば、配列表の配列番号：1のアミノ酸番号36～50（配列番号：2）、63～83（配列番号：3）、95～111（配列番号：4）、114～127（配列番号：5）、137～151（配列番号：6）、163～181（配列番号：7）で表されるポリペプチド等が挙げられる。この中でも、例えば、抗Cochlin N末端フラグメント抗体を作製するための抗原ポリペプチドとしては、配列表の配列番号：1のアミノ酸番号36～50（配列番号：2）、63～83（配列番号：3）、95～111（配列番号：4）、114～127（配列番号：5）で表されるポリペプチド等が好ましく用いられ、アミノ酸番号36～50（配列番号：2）で表されるポリペプチドが特に好ましく用いられる。また、例えば、アイソフォームp63、p44、p40の3つのアイソフォームを全て認識し得る抗体を作製するための抗原ポリペプチドとしては、アミノ酸番号163～181（配列番号：7）で表されるポリペプチドが好ましく用いられる。

【0036】

抗体の作製は、それ自体公知の通常用いられる方法を用いて行うことができる。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、ポリクローナル抗体が好ましく用いられる。具体的には、例えば、ポリクローナル抗体を作製する場合には、KLH（キーホール・リンペット・ヘモシアニン）、BSA（牛血清アルブミン）、豚甲状腺グロブリン等の担体蛋白に、カルボジイミド、マレイミド等の適当な縮合剤を用いて前記抗原ポリペプチドを結合させ、免疫用の抗原（免疫原）を作製する。ここで、担体蛋白への抗原ポリペプチドの結合は

、それ自体公知の通常用いられる方法により行えばよいが、例えばKLHを担体蛋白として用いて、マレイミド化により抗原ポリペプチドを結合させる方法の場合には、KLHに、好ましくはSulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) 等の二官能性の縮合剤を反応させてマレイミド化し、これにN末端又はC末端のうち結合を生じさせたい方の末端にシステインを付加した抗原ポリペプチドを反応させれば、チオールを介して容易に結合して免疫原を調製することができる。選択した抗原ポリペプチドのアミノ酸配列中にシステインが含まれる場合には、これを利用して結合させることもできる。また、カルボジイミド化されたKLHを用いた場合には、抗原ポリペプチドとの脱水縮合によりペプチド結合を形成させて結合させることができる。

【0037】

このように調製した免疫原を含む溶液を、必要に応じてアジュバントと混合し、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等、通常抗体の製造に用いられる動物の皮下又は腹腔に2～3週間毎に繰り返し免疫する。免疫後、適宜試験的に採血を行って、ELISA法、ウエスタンブロッティング法等の免疫学的方法により力価（抗体価）が十分に上昇していることを確認することが好ましい。十分な力価の上昇が確認された動物から採血を行い、血清を分離することによって抗血清が得られる。ニワトリの場合には、鶏卵から採取した卵黄から水溶性の画分を分取して卵黄抽出液を調製し、これも抗血清同様に用いることができる。

【0038】

本発明においては、得られた抗血清等を精製することなくそのまま用いることもできるが、以下の方法により精製して用いることが好ましい。例えば、Protein Aを用いた精製法、硫酸アンモニウムを用いた塩析による方法、イオン交換クロマトグラフィー等によって、イムノグロブリン画分を精製する方法、あるいは、特定のポリペプチドを固定化したカラムを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製する方法等が挙げられるが、このうち、Protein Aを用いた精製法とアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いる方法を、いずれかもしくは組み合わせて行うことが好ましい。ここで、カラムに固定化する精

製用のポリペプチドとしては、用いた抗原ポリペプチドのアミノ酸配列に応じて、それと同じ配列、もしくはその一部の配列を含むポリペプチドを選択して用いればよい。

【0039】

また、モノクローナル抗体を作製する場合には、上記と同様にして免疫した動物の脾臓から抗体産生細胞を採取し、常法によって、同系動物等由来のミエローマ細胞等の培養細胞と融合させてハイブリドーマを作製 (Milstein et al., Nature, 256, 495(1975)) する。培養を行って、適宜ELISA法やウエスタンブロッティング法等により抗体価を確認して、目的のエピトープを認識するモノクローナル抗体を産生し、かつ、抗体産生能の高いハイブリドーマを選択すればよい。かくして選択されるハイブリドーマの培養上清から、目的のモノクローナル抗体を得ることができる。

【0040】

かくして得られる抗体は、いずれもCochlinを特異的に認識する抗体である。このことは、内耳組織等のCochlinが存在することが知られている組織を適当な動物種から採取し、これを抽出液として調製して、該抽出液を陽性コントロールとして用いたり、又は、抗原ポリペプチドとして用いたアミノ酸配列を有するポリペプチドを化学的に合成し、これらとの反応性を解析すること等によって確認できる。

【0041】

なお、本明細書で抗体と言う場合、全長の抗体だけではなく抗体の断片も包含する。抗体の断片とは、機能性の断片であることが好ましく、例えば、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ などが挙げられる。 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ とは、イムノグロブリンを、蛋白分解酵素（例えば、ペプシン又はパパイン等）で処理することにより製造されるもので、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体断片である。さらに、抗体の断片の中には、該抗体をコードする遺伝子由来の抗原結合部位を含む蛋白質も包含される。

【0042】

例えば、IgG1をパパインで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存

在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL (L鎖可変領域) とCL (L鎖定常領域) からなるL鎖、及びVH (H鎖可変領域) とCH_γ1 (H鎖定常領域中のγ1領域) とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントを製造することができる。これら2つの相同な抗体フラグメントを各々Fab' という。またIgGをペプシンで処理すると、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の下流で切断されて前記2つのFab' がヒンジ領域でつながったものよりやや大きい抗体フラグメントを製造することができる。この抗体フラグメントをF(ab')₂という。

【0043】

また、本発明の抗体は、固相担体などの不溶性担体上に担持された固定化抗体として使用したり、標識物質で標識した標識抗体として使用することができる。このような固定化抗体や標識抗体は全て本発明の範囲内である。

【0044】

固定化抗体とは、不溶性担体に物理的吸着あるいは化学的結合等によって担持された状態にある抗体を言う。これらの固定化抗体は、中耳に存在する体液中に含まれるCochlinを検出又は定量するために用いることができる。抗体を担持させるのに使用できる不溶性担体としては、例えば、(1) ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂あるいはナイロン樹脂等からなるプラスチックや、ガラス等に代表されるような水に不溶性の物質からなるプレート、試験管若しくはチューブ等の内容積を有するもの、ビーズ、ボール、フィルター、あるいはメンブレン等、並びに(2) セルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体あるいは多孔性シリカ系担体等のようなアフィニティークロマトグラフィーに用いられる不溶性担体を挙げることができる。

【0045】

標識抗体とは、標識物質で標識された抗体を意味し、これらの標識抗体は、中耳に存在する体液中に含まれるCochlinを検出または定量するために用い

ることができる。本発明で用いることができる標識物質は、抗体に物理的結合又は化学的結合等により結合させることによりそれらの存在を検出可能にするものであれば特に限定されない。標識物質の具体例としては、酵素、蛍光物質、化学発光物質、ビオチン、アビジンあるいは放射性同位体等が挙げられ、より具体的には、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等の放射性同位体、ビオチン、アビジン、または化学発光物質が挙げられる。標識物質と抗体との結合法は、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法又は過ヨウ素酸法等の公知の方法を用いることができる。

【0046】

ここで、放射性同位体及び蛍光物質は単独で検出可能なシグナルをもたらすことができるが、酵素、化学発光物質、ビオチン及びアビジンは、単独では検出可能なシグナルをもたらすことができないため、さらに1種以上の他の物質と反応することにより検出可能なシグナルを生じる。例えば、酵素の場合には少なくとも基質が必要であり、酵素活性を測定する方法（比色法、蛍光法、生物発光法あるいは化学発光法等）に依存して種々の基質が用いられる。また、ビオチンの場合には少なくともアビジンあるいは酵素修飾アビジンを反応させるのが一般的である。必要に応じてさらに該基質に依存する種々の発色物質が用いられる。

【0047】

上記した抗Cochlin抗体（その断片、標識抗体、固相化抗体などを含む）は、外リンパ瘻検出用試薬として使用することができる。当該試薬の形態は特に限定されず、固体でも液体（溶液、懸濁液など）でもよい。液体の場合には適当な溶媒（抗体を安定に保存できる緩衝液など）に上記抗体を溶解または懸濁することによって試薬を調製することができる。

【0048】

3. 外リンパ瘻の検出を行うために用いる試薬キット

本発明の試薬キットは、少なくとも試料中の外リンパ由来のCochlinの存在を検出するための抗体を含んでなり、上記した外リンパ瘻の検出に用いられるためのものである。該試薬キットを用いれば、本発明の外リンパ瘻の検出を必要時に簡便・迅速に行うことができ、その結果を、他の疾患との鑑別や、治療方針の決定等に役立てることができる。

【0049】

本発明の試薬キットは、本発明の検出方法を行うことのできるものであればいかなる構成であってもよい。例えば、ELISA法を用いてCochlinの検出を行う試薬キットの場合には、少なくともCochlinの存在を検出するための抗体と、酵素標識された二次抗体を含み、その他に、試料中のCochlinを吸着させるための固相、酵素基質、希釈液や洗浄液等の緩衝液、陽性コントロール等を含めることができる。このように、本発明の試薬キットは、少なくとも試料中のCochlinの存在を検出するための抗体を含み、それ自体公知の通常用いられる試薬等を組み合わせて作製することができる。

【0050】

【実施例】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

なお、下記の実施例において、「SDS」はドデシル硫酸ナトリウム、「PBS」はPhosphate Buffered Saline、「DAB」は3,3'-Diaminobenzidine、「HRP」はHorse Radish Peroxidaseを意味する。

【0051】

実施例1. 抗体の作製

Cochlinの3種類のアイソフォームに対するポリクローナル抗体として、アイソフォームp63のみを認識する抗体（以下、これを「抗LCCL抗体」と称することがある）、アイソフォームp63及びp44を認識する抗体（以下、これを「抗p63/44抗体」と称することがある）、及び、全てのアイソフォームを認識する抗体（以

下、これを「抗p63/44/40抗体」と称することがある)の3種類を作製した。抗体の作製は、宝酒造株式会社に外注した。

【0052】

(1) 抗原ポリペプチドのアミノ酸配列の選択

3種類の抗体の作製に用いる抗原ポリペプチドとしては、ヒト、ウシ、マウスのCochlinのアミノ酸配列 (N.G.Robertson, Nature Genet., 20, 299-303(1998); Ikezono et al., Biochem.Biophys.Acta, 1535, 3, 258-265(2001)) をアライメントし、それらの種に共通の配列であって、かつ抗原性に優れた部分を選択した。選択にあたっては、「Epitope Adviser」(富士通九州システムエンジニアリング社製)を用いて行った解析の結果を参考にした。その結果より、抗LCCL抗体作製用の抗原ポリペプチドとしてはアイソフォームp63のN末端に存在する15アミノ酸よりなるポリペプチド(配列番号: 2)を選択した。これは、配列表の配列番号: 1のアミノ酸番号36~50に相当する。抗p63/44抗体作製用の抗原ポリペプチドとしては、アイソフォームp44のN末端に存在し、アイソフォームp63及びp44に共通の15アミノ酸よりなるポリペプチド(配列番号: 3、配列表の配列番号: 1のアミノ酸番号137~151に相当)を選択した。さらに、抗p63/44/40抗体作製用の抗原ポリペプチドとしては、アイソフォームp40のN末端に存在する全てのアイソフォームに共通の19アミノ酸の配列よりなるポリペプチド(配列番号: 4、配列表の配列番号: 1のアミノ酸番号163~181に相当)を、それぞれ選択した。

【0053】

(2) 抗体の作製

上記(1)において選択されたアミノ酸配列を有する各抗原ポリペプチドを用いたポリクローナル抗体の作製を、宝酒造株式会社に外注した。宝酒造株式会社による抗体作製の手順は、次のとおりであった。

【0054】

まず、前記抗原ポリペプチド10mg (80%)をそれぞれ化学合成により調製し、KLH (キーホール・リンペット・ヘモシアニン) 2mgに、Cys (システイン)を介したマレイミド法によって結合させて免疫原とした。ここで、抗p63/44抗体及び

抗p63/44/40抗体作製用の抗原ポリペプチドについては、該アミノ酸配列中にシステインが含まれていないので、抗p63/44抗体作製用の抗原ポリペプチドはC末端、抗p63/44/40抗体作製用の抗原ポリペプチドはN末端にシステインが付加されたポリペプチドを合成し、これを用いた。この免疫原を、ウサギ1羽に対して2週間間隔で計4回感作したが、3回目の感作の後には、ELISA法（酵素免疫測定法）による力価測定を実施して力価上昇を確認した。感作後、公知の方法に従って抗血清1mlを採取して、得られた抗血清全量をProtein Aにより精製した。次に、Protein Aで精製された抗血清のうち80%相当量を、CNBr活性を有するセファロース5gにあらかじめ前記抗原ポリペプチド5mgを結合させて調製しておいたペプチドアフィニティカラムに通してさらに精製した。各操作は、それ自体公知の通常用いられる方法に従って行った。

【0055】

（3）抗体の特異性の確認

上記（2）において作製された抗体の特異性は、ウシの内耳組織より調製した内耳蛋白質溶液（陽性コントロール）を抗原としたウエスタンブロッティングにより確認した。

【0056】

まず、ウシ側頭骨（東京芝浦臓器（株）より購入）から採取した内耳膜迷路180mgに対し、氷中で1mlの蛋白抽出液（Complete mini Ca(-)（Boehringer Mannheim社製）1 tabを、10ml PBS、0.5%SDSに溶解したもの（pH7.4））を添加し、ラプチューブミキサー及びディスボ攪拌ペストル（GHI社製）を用いて肉眼的に残存組織が確認できなくなるまでホモジェネートした後、1000gで15分間遠心分離して、得られた上清を内耳蛋白質溶液とした。陽性コントロールとしては、該溶液0.5 μ lを使用した。ウエスタンブロッティングは、後記実施例2. に詳述する方法に従って行った。

【0057】

その結果、抗LCCL抗体を用いた解析では約63kDaの位置にバンドが見られ、アイソフォームp63を認識していることが確認された。抗p63/44抗体を用いた解析では、約63kDa及び44kDaの位置にバンドが検出され、この抗体がアイソフォーム

p63及びp44を認識することが確認された。また、抗p63/44/40抗体を用いた解析では、アイソフォームp63、p44、p40の3本のバンドが検出され、この抗体が全てのアイソフォームを認識することが確認された。このように、作製した3種類の抗体を用いれば、内耳組織に存在する3種類のCochlinのアイソフォームを区別できることが示された。

【0058】

実施例 2. 本発明の抗体を用いた外リンパ及び内耳組織の解析

上記実施例 1 において作製した3種類の抗体を用いて、ウエスタンブロッティングによる外リンパ及び内耳組織の解析を行った。

(1) 電気泳動及びウエスタンブロッティング用試薬の調製

(i) sample bufferの調製

1M Tris-HCl(pH 6.8) 18.75ml, 2-mercaptoethanol 15ml, glycerol 30ml, 10% SDS 6.9ml, 0.1% bromophenol blue 3ml に、蒸留水を加えて合計100mlに調製した。最終濃度は、0.188M Tris buffer, 2.39mM SDS。

【0059】

(ii) size markerの調製

市販のサイズマーカー (prestained protein marker weight standards, High range着色済みタンパク質分子量スタンダード (高分子量用) ; Cat.No.#26041-020 (Gibco社製)) 1 vialを、500 μ lの1mM DTT、10%glycerolに溶解し、5分間煮沸後、冷却して20 μ l/tubeに分注し、-80℃に保存した。用時にこれを融解して用いた。

【0060】

(iii) running bufferの調製

Tris Base 15g/l, Glycine 72g/l, SDS 5g/lをMilliQ (MILLIPORE社製) 水に溶解してストック用の5倍濃縮液を調製した。これを用時希釈して最終濃度25mM Tris, 192mM Glycine, SDS 1g/l(pH 8.3)で用いた。

(iv) transfer bufferの調製

3.03g Tris, 14.4g glycine, 200ml Methanolを蒸留水に溶解し、最終濃度25mM Tris, 192mM Glycine, 20% v/v Methanol(pH 8.3)とした。

【0061】

(v) washing bufferとしては、0.1%Tween PBS(pH7.4)を用いた。

(v i) blocking bufferの調製

dry milk (雪印社製スキムミルク) を、最終濃度が5%になるように0.2% tween in PBS(pH7.4)に溶解した。

(v i i) antibody dilution bufferの調製

dry milk (雪印社製スキムミルク) を、最終濃度が1%になるように0.1% tween in PBS(pH7.4)に溶解した。

【0062】

(v i i i) ポンゾー染色液の調製

30g Trichloroacetic Acid、30g Sulfosalicylic Acid、2g PonceauSを100mlのMilliQ水に溶解し、ストック用の10×濃縮液とした。使用時にMilliQ水で10倍希釈して使用した。

(i x) DAB液の調製

DAB溶液は、用時調製して用いた。DAB 10mg (10mg tablet ; Cat.No.049-22831 (Wako社製)) を20mlの50mM Tris Buffer (pH7.6) に溶解後、30% H₂O₂ 20 μ l を添加した。これを0.45 μ mのフィルター (MILLIPORE社製) で濾過してから用いた。

【0063】

(2) 試料の調製

試料としては、ヒト、ウシ、モルモットの内耳組織及び外リンパを用いた。

ヒト試料については、患者に対して採取及び研究目的の使用について十分な説明を行い、同意を得られた後に用いた。内耳組織の抽出液は、聴神経腫瘍手術の際に採取されたヒト内耳膜迷路を計量し、組織量180mgに対して1mlの蛋白抽出液 (Complete mini Ca(-) (Boehringer Mannheim社製) 1 tabを、10ml PBS、0.5% SDSに溶解したもの(pH7.4)) を添加し、ラブチューブミキサー及びディスボ攪拌ペストル (GHI社製) を用いて肉眼的に残存組織が確認できなくなるまでホモジェネートした後、1000gで15分間遠心分離して、得られた上清を内耳蛋白質溶液とした。電気泳動には、これを2 μ l及び0.5 μ l用いた。外リンパは、人工内耳装

着手術時にドリルで蝸牛の基底回転外リンパ腔に孔をあけ、電極を挿入する際に漏出した外リンパを回収してこのうち2 μ lを泳動した。

【0064】

ウシ試料としては、内耳組織の抽出液には、上記実施例1の(3)で調製したものを実施例1と同様に0.5 μ lを用いた。また、ウシ側頭骨(東京芝浦臓器(株)より購入)の外耳道を手術用ドリルで削開し、鼓膜を切除して中耳に到達、あぶみ骨を摘出除去し卵円窓より外リンパを採取した。このとき、内耳組織の混入なく外リンパを採取するように留意した。試料としては、採取した外リンパのうち2 μ lを用いた。モルモット内耳組織の抽出液は、ハートレイ系モルモット側頭骨(三共ラボサービス(株)より購入)から採取した内耳膜迷路180mgに対して、氷中で1mlの蛋白抽出液(Complete mini Ca(-)(Boehringer Mannheim社製)1 tabを、10ml PBS、0.5%SDSに溶解したもの(pH7.4))を添加し、ラブチューブミキサー及びディスポ搅拌ベストル(GHI社製)を用いて肉眼的に残存組織が確認できなくなるまでホモジェネートした後、1000gで15分間遠心分離して、得られた上清を内耳蛋白質溶液とした。これを0.5 μ l用いた。外リンパは、鼓膜を切除して中耳に到達、あぶみ骨を摘出除去し卵円窓より外リンパを採取した。このうち2 μ lを用いた。

【0065】

各試料の容量200に対して、上記(1)で調製したsample bufferを85、2-mercaptoethanolを15の割合で混合し、溶解させた。調製された各試料溶液は95℃で3分間インキュベートした後、室温に冷却して3000rpmで10秒間遠心分離し、各15 μ lを分取して泳動に供した。

【0066】

(3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

各抗体検出用として、15%ポリアクリルアミドゲル(レディゲルJ;縦73mm×幅80mm×厚さ1mm(Bio-Rad社製))計3枚に上記(2)で調製した各試料溶液をアプライし、電気泳動装置(Bio-Rad社製)に装着して、上記(1)で調製したrunning bufferを使用して泳動を行った。泳動は60分、27mA[1枚のゲルあたり]で行った。

【0067】

(4) ウエスタンブロッティングによる解析

上記(3)において電気泳動を行ったゲル3枚を、上記(1)で調製したtransfer bufferを使用して、100Vで90分間、ニトロセルロース膜(0.45 μ m; Cat.no. #162-0145 (Bio-Rad社製))にそれぞれ転写した。転写装置としてはウェット式プロッター (Bio-Rad社製) を用いた。

転写後、ニトロセルロース膜をポンゾー染色液に5分間浸した後、MilliQ水で脱色し、各試料溶液中の蛋白質が染色された様子を確認した。確認後、蒸留水中で5分間振動させながら脱色した。

【0068】

次に、DAB染色法(酵素発色法)による検出及び解析を行った。まず、前記ニトロセルロース膜3枚を、非特異的反応をブロックするためにblocking buffer中に4℃で1昼夜浸した。これをwashing bufferで5分間、3回洗浄し、実施例1で作製した1次抗体と反応させた。1次抗体としては、抗LCCL抗体はantibody dilution bufferで1000倍に希釈、抗p63/44抗体及び抗p63/44/40抗体は同bufferで500倍に希釈して、それぞれ1枚ずつのニトロセルロース膜に添加した。反応は、振動させながら2時間行った。

【0069】

得られた反応後の膜を、前記washing bufferで15分間、3回洗浄した後、2次抗体との反応を行った。2次抗体としては、ヤギ由来anti rabbit IgG antibody (HRP標識; Cat.No.p-0448 (Dako社製))を、前記antibody dilution bufferで1000倍に希釈したものを扱い、振動させながら1時間反応させた。これを前記washing bufferで15分間、3回洗浄した後、上記(1)で調製したDAB液と反応させ、発色させた。反応は、蒸留水に浸すことで停止させた。

それぞれの解析の結果を、図1に示した。

【0070】

抗LCCL抗体を用いた解析の結果、ヒト、ウシ、モルモットの全ての動物種において、内耳組織の抽出液で63kDaのバンド(図中の矢印で示すバンド)が検出された。外リンパでは、全ての動物種において16kDaにクリアーな細目のバンド(

図中のアスタリスク (*) で示すバンド) が検出された。抗p63/44抗体を用いた解析では、全ての動物種の内耳組織の抽出液において63kDa及び44kDaのバンドが検出され、外リンパでは主要なバンドは見られなかった。抗p63/44/40抗体を用いた解析では、全ての動物種の内耳組織抽出液において63kDa、44kDa、40kDaの3本のバンドが検出されたが、外リンパでは主要なバンドは見られなかった。

【0071】

これらの結果より、3種類の抗体がいずれの種においても同様の反応を示し、3種類のアイソフォームを区別できることが確認できた。また、外リンパ中には約16kDaの蛋白質が存在することがわかり、該蛋白質は抗LCCL抗体によってのみ認識され、抗p63/44抗体及び抗p63/44/40抗体には認識されないことから、アイソフォームp63のN末端部分のアミノ酸配列 (p44及びp40が有していない配列) を有するフラグメントよりなる蛋白質であることが示唆された。

この外リンパにのみ存在する16kDaの蛋白質に着目し、抗LCCL抗体を用いて、さらに検討を進めることとした。

【0072】

実施例3. 本発明の抗体を用いた外リンパ瘻の検出

上記実施例2における解析の結果、本発明の抗体によって外リンパにのみ存在する16kDaの蛋白質が検出されたことから、該蛋白質を指標とする外リンパ瘻の検出方法について検討を行った。検討には、抗LCCL抗体を用いた。

(1) 電気泳動及びウエスタンブロッティング用試薬の調製

すべて、上記実施例2の(1)と同様にして行った。

【0073】

(2) 試料の調製

ヒトの中耳に存在し得る外リンパ以外の体液として、CSF、血清、唾液、滲出性中耳炎の滲出液を含む中耳洗浄液、慢性中耳炎の耳漏を含む中耳洗浄液を用いた。外リンパ瘻検出の試みとして、急性感音難聴を発症した外リンパ瘻疑いの患者から採取した中耳洗浄液を用いた。外リンパ瘻と鑑別されるべき疾患として、メニエール病の患者から得られた中耳洗浄液を用いた。また、人工内耳手術、あぶみ骨手術、外側半規管瘻孔、外傷の各患者の内耳から漏出した外リンパを試料

として用いた。各試料については、患者に対して採取及び研究目的の使用について十分な説明を行い、同意を得られた後に用いた。

【0074】

CSFは、髄膜炎及び脳炎の疑いで検査が行われ、結果が正常であった患者のCSFの一部を用いた。血清は、健常者の静脈血を用いた。唾液は健常者から採取したものをを用いた。滲出性中耳炎の浸出液を含む中耳洗浄液、慢性中耳炎の耳漏を含む中耳洗浄液、及びメニエール病の患者からの中耳洗浄液は、それぞれ患者の鼓膜を微小に切開し、シリンジを用いて微量の生理食塩水を注入した後、これを再度シリンジにより回収して採取した。外リンパ瘻疑いの患者の中耳洗浄液は、鼓室開放術が施術された際に採取した。

【0075】

種々の傷病の患者の内耳から漏出した外リンパの採取は、次のようにして行なった。まず、人工内耳手術患者の外リンパは、人工内耳装着手術時にドリルで蝸牛の基底回転外リンパ腔に孔をあけ、電極を挿入する際に漏出した外リンパを回収した。耳硬化症のためにあぶみ骨手術を行った患者の外リンパは、あぶみ骨の底板（卵円窓）に孔をあけて人工耳小骨を挿入する際に漏出した外リンパを回収した。外側半規管瘻孔を有する患者の外リンパとしては、外耳道癌切除のために外耳道全摘出手術を行った際に、中耳の外側半規管隆起部分にあいた孔とその周辺部分を生理食塩水で洗浄し、その洗浄液を回収した。外傷患者の外リンパとしては、外傷による内耳骨折により漏出した外リンパ（外傷性側頭骨骨折血性中耳浸出液）を採取した。人工内耳手術患者の外リンパについては、これをそれぞれ5倍、50倍、500倍に希釈したものをさらに調製し、これらも同様にして用いた。

【0076】

これらの各試料と、上記実施例2で用いたウシ外リンパ及びウシ内耳蛋白質溶液（陽性コントロール）について、それぞれ下記の表1に示したとおりに分取し、容量200に対して上記（1）で調製したsample bufferを85、2-mercaptoethanolを15の割合で混合し、溶解させた。調製された各試料溶液は95℃で3分間インキュベートした後、室温に冷却して3000rpmで10秒間遠心分離し、各15 μ lを分取して泳動に供した。

【0077】

(3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

15%ポリアクリルアミドゲル (レディゲルJ; 縦73mm×幅80mm×厚さ1mm (Bio-Rad社製)) に上記 (2) で調製した各試料溶液をアプライし、電気泳動装置 (Bio-Rad社製) に装着して、上記 (1) で調製したrunning bufferを使用して泳動を行った。泳動は60分、27mA[1枚のゲルあたり]で行った。

【0078】

(4) ウエスタンブロッティングによる解析

上記 (3) において電気泳動を行ったゲルを、上記 (1) で調製したtransfer bufferを使用して、100Vで90分間、ニトロセルロース膜 (0.45 μ m; Cat.no.#162-0145 (BioRad社製)) に転写した。転写装置としてはウェット式プロッター (Bio-Rad社製) を用いた。

転写後、ニトロセルロース膜をボンゾー染色液に5分間浸した後、MilliQ水で脱色し、各試料溶液中の蛋白質が染色された様子を確認した。確認後、蒸留水中で5分間振動させながら脱色した。

【0079】

次に、化学発光法による検出及び解析を行った。転写後のニトロセルロース膜を、非特異的反応をブロックするためにblocking buffer中に4℃で1昼夜浸した。これをwashing bufferで5分間、3回洗浄し、1次抗体と反応させた。1次抗体としては、抗LCCL抗体をantibody dilution bufferで1000倍に希釈して、ニトロセルロース膜に添加した。反応は、振動させながら2時間行った。

【0080】

2次抗体としては、ヤギ由来anti rabbit IgG antibody (HRP標識) (Dako社製; Cat.No.#p-0448) を、前記antibody dilution bufferで1000倍に希釈したものを、用い、振動させながら1時間反応させた。これを前記wash bufferで15分間、3回洗浄した後、化学発光キット (ECL plus; アマシヤムファルマシアバイオテック社製) を用いて化学発光させ、発生したシグナルをフィルム (Kodak Scientific Imaging Film; Cat.No.#165-1454 (Kodak社製)) に感光させた。フィルムの露光時間は、表1のWell No. 1～12の試料をプロットした1枚目のニトロセル

ロース膜については約1分間、Well No. 13～24の試料をプロットした2枚目のニトロセルロース膜については1時間とした。Well No. 25～36の試料をプロットした3枚目のニトロセルロース膜については、10秒間露光した場合と、1時間露光した場合と、2通りの実験を行って露光時間による違いを比較した。

【0081】

結果を図2～4に示した。図中、写真の上の数字は表1のWell No.を、下の記載はそのWellに供された試料を示す。図2は表1のWell No. 1～12の試料をプロットした1枚目のニトロセルロース膜、図3はWell No. 13～24の試料をプロットした2枚目のニトロセルロース膜、図4はWell No. 25～36の試料をプロットした3枚目のニトロセルロース膜について、化学発光法による検出を行った結果の写真である。各試料の電気泳動に供したサンプル量、Well No.、及び結果の一覧を表1に示した。

【0082】

【表1】

試料名		Well No.	分取した 試料量 (μ l)	結果
ヒト脳脊髄液 (CSF) 1-4		4-7	7	—
ヒト血清 1-3		8-10	3/100	—
ヒト唾液		12	7	—
人工内耳	×1	3, 14	2	+
	×5	15	2	+
	×50	16, 26	2	+
	×500	17	2	—
外側半規管瘻孔		18	2	+
アブミ骨手術	1	19, 27	2	+
	2	20, 28	4	+
	3	32	0.5	+
メニエール病	1	21, 35	10	—
	2	36	10	—
滲出性中耳炎	1	22	2	—
	2	23	2	—
	3	24	2	—
慢性中耳炎		31	10	—
外傷性側頭骨骨折血性 中耳浸出液		34	2	+
外リンパ瘻疑い	1	29	10	+
	2	30	16	—
ウシ外リンパ		2	2	+
ウシ内耳組織抽出液		11	0.5	—(63kは+)
サイズマーカー		1, 13, 25		

※ウェル No.33 は試料アプライせず。

【0083】

ヒト外リンパ（人工内耳手術（図2の3、図3の14～17、図4の26）、外側半規管瘻孔（図3の18）、あぶみ骨手術（図3の19、20、図4の27、28及び32）、外傷（図4の34）の各患者から得られた外リンパ）では、全例において約16kDaに明瞭な細目のバンドが検出された。人工内耳手術患者由来の外リンパを系列希釈したウェルの結果（図3の14～17）より、ヒトから採取された外リンパは、50倍程度まで希釈しても検出可能であることがわかった。外リンパ瘻疑いの患者から得られた中耳洗浄液では、1例が陽性、1例は陰性であった（図4の29が陽性、30が陰性）。メニエール病（図3の21、図4の35、36）、滲出性中耳炎（図3の22～24）、慢性中耳炎（図4の31

）の各患者の中耳洗浄液は陰性であった。ヒトCSF（図2の4～7）、ヒト血清（図2の8～10）、ヒト唾液（図2の12）でも、該抗体で検出されるバンドは認められなかった。

【0084】

ウシ外リンパではやや幅の広い16kDaのバンドが検出された（図2の2）。陽性コントロールであるウシ内耳蛋白質溶液にはアイソフォームp63と考えられる63kDaのバンドが検出されたが、蛋白量が多量であるためにover exposureとなり、該当部分が白く抜けたように見られた（図2の11）。

【0085】

また、図4に示すように、1時間の露光を行った場合（図4の上の写真）には、約16kDaのN末端フラグメント以外のバンドも検出されるが、それらは明らかに目的のバンドと区別が可能であった。例えば、特に外傷患者の外リンパ（図4の34）等では、外リンパ採取時に生じた溶血のために約60kDaにアルブミンと考えられるバンドが検出されるが、16kDaに検出される目的のバンドとは明らかに区別が可能であった。また、10秒間の露光でも試料中のCochlinが検出できることも確認された（図4の下の写真）。

【0086】

これらの結果より、該16kDaの蛋白質は、ヒトの中耳に存在する可能性のある他の体液、すなわち、CSF、血清、唾液、滲出性中耳炎の中耳滲出液、慢性中耳炎の耳漏等には一切検出されず、またメニエール病患者の中耳洗浄液にも検出されないものであって、ヒト外リンパのみで検出されたことから、外リンパ瘻の検出に非常に有用であることがわかった。

【0087】

【発明の効果】

本発明によれば、簡便、確実で、かつ患者への侵襲度の低い外リンパ瘻の検出方法が提供される。該方法により、従来不可能とされてきた外リンパ瘻の確定診断を行うことができ、メニエール病、突発性難聴等の他の急性感音難聴と外リンパ瘻とを、臨床現場において実質的に鑑別することが可能になる。これにより、迅速かつ適切な治療方針の決定を行うことができ、治癒率を大きく改善すること

ができる。

【0088】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nippon Medical School

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> A method for detecting Perilymph fistula

<130> A21400A

<160> 7

【0089】

<210> 1

<211> 550

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(24)

<400> 1

Met Ser Ala Ala Trp Ile Pro Ala Leu Gly Leu Gly Val Cys Leu Leu

1

5

10

15

Leu Leu Pro Gly Pro Ala Gly Ser Glu Gly Ala Ala Pro Ile Ala Ile

20

25

30

Thr Cys Phe Thr Arg Gly Leu Asp Ile Arg Lys Glu Lys Ala Asp Val

35

40

45

Leu Cys Pro Gly Gly Cys Pro Leu Glu Glu Phe Ser Val Tyr Gly Asn

50

55

60

Ile Val Tyr Ala Ser Val Ser Ser Ile Cys Gly Ala Ala Val His Arg

65

70

75

80

Gly Val Ile Ser Asn Ser Gly Gly Pro Val Arg Val Tyr Ser Leu Pro

	85	90	95
Gly Arg Glu Asn Tyr Ser Ser Val Asp Ala Asn Gly Ile Gln Ser Gln			
100	105	110	
Met Leu Ser Arg Trp Ser Ala Ser Phe Thr Val Thr Lys Gly Lys Ser			
115	120	125	
Ser Thr Gln Glu Ala Thr Gly Gln Ala Val Ser Thr Ala His Pro Pro			
130	135	140	
Thr Gly Lys Arg Leu Lys Lys Thr Pro Glu Lys Lys Thr Gly Asn Lys			
145	150	155	160
Asp Cys Lys Ala Asp Ile Ala Phe Leu Ile Asp Gly Ser Phe Asn Ile			
165	170	175	
Gly Gln Arg Arg Phe Asn Leu Gln Lys Asn Phe Val Gly Lys Val Ala			
180	185	190	
Leu Met Leu Gly Ile Gly Thr Glu Gly Pro His Val Gly Leu Val Gln			
195	200	205	
Ala Ser Glu His Pro Lys Ile Glu Phe Tyr Leu Lys Asn Phe Thr Ser			
210	215	220	
Ala Lys Asp Val Leu Phe Ala Ile Lys Glu Val Gly Phe Arg Gly Gly			
225	230	235	240
Asn Ser Asn Thr Gly Lys Ala Leu Lys His Thr Ala Gln Lys Phe Phe			
245	250	255	
Thr Val Asp Ala Gly Val Arg Lys Gly Ile Pro Lys Val Val Val Val			
260	265	270	
Phe Ile Asp Gly Trp Pro Ser Asp Asp Ile Glu Glu Ala Gly Ile Val			
275	280	285	
Ala Arg Glu Phe Gly Val Asn Val Phe Ile Val Ser Val Ala Lys Pro			
290	295	300	
Ile Pro Glu Glu Leu Gly Met Val Gln Asp Val Thr Phe Val Asp Lys			
305	310	315	320

Ala Val Cys Arg Asn Asn Gly Phe Phe Ser Tyr His Met Pro Asn Trp
 325 330 335
 Phe Gly Thr Thr Lys Tyr Val Lys Pro Leu Val Gln Lys Leu Cys Thr
 340 345 350
 His Glu Gln Met Met Cys Ser Lys Thr Cys Tyr Asn Ser Val Asn Ile
 355 360 365
 Ala Phe Leu Ile Asp Gly Ser Ser Ser Val Gly Asp Ser Asn Phe Arg
 370 375 380
 Leu Met Leu Glu Phe Val Ser Asn Ile Ala Lys Thr Phe Glu Ile Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Gly Ala Lys Ile Ala Ala Val Gln Phe Thr Tyr Asp Gln Arg
 405 410 415
 Thr Glu Phe Ser Phe Thr Asp Tyr Ser Thr Lys Glu Asn Val Leu Ala
 420 425 430
 Val Ile Arg Asn Ile Arg Tyr Met Ser Gly Gly Thr Ala Thr Gly Asp
 435 440 445
 Ala Ile Ser Phe Thr Val Arg Asn Val Phe Gly Pro Ile Arg Glu Ser
 450 455 460
 Pro Asn Lys Asn Phe Leu Val Ile Val Thr Asp Gly Gln Ser Tyr Asp
 465 470 475 480
 Asp Val Gln Gly Pro Ala Ala Ala Ala His Asp Ala Gly Ile Thr Ile
 485 490 495
 Phe Ser Val Gly Val Ala Trp Ala Pro Leu Asp Asp Leu Lys Asp Met
 500 505 510
 Ala Ser Lys Pro Lys Glu Ser His Ala Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr
 515 520 525
 Gly Leu Glu Pro Ile Val Ser Asp Val Ile Arg Gly Ile Cys Arg Asp
 530 535 540
 Phe Leu Glu Ser Gln Gln

545

550

【0090】

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Thr Arg Gly Leu Asp Ile Arg Lys Glu Lys Ala Asp Val Leu Cys

1

5

10

15

【0091】

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Val Ser Thr Ala His Pro Ala Thr Gly Lys Arg Leu Lys Lys

1

5

10

15

【0092】

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Ala Asp Ile Ala Phe Leu Ile Asp Gly Ser Phe Asn Ile Gly Gln

1

5

10

15

Arg Arg Phe

【0093】

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gly Asn Ile Val Tyr Ala Ser Val Ser Ser Ile Cys Gly Ala Ala Val

1 5 10 15

His Arg Gly Val Ile

20

【0094】

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Leu Pro Gly Arg Glu Asn Tyr Ser Ser Val Asp Ala Asn Gly Ile Gln

1 5 10 15

Ser

【0095】

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Leu Ser Arg Trp Ser Ala Ser Phe Thr Val Thr Lys Gly Lys

1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ヒト、ウシ、モルモットの内耳組織抽出液及び外リンパを、抗p63/44抗体、抗p63/44抗体、及び抗LCCL抗体の3種類の抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した結果を示す。

【図2】

図2は、ヒト由来の各種試料を、抗LCCL抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した結果を示す。図中、1～12のウェル番号は、表1に記載の各ウェル番号に対応し、写真の下に記載はそのウェルに供された試料を示す。各試料名の下に記載は、「+」は16kDaの蛋白質が検出されたことを示し、「-」は検出されなかったことを示す。

【図3】

図3は、ヒト由来の各種試料を、抗LCCL抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した結果を示す。図中、13～24のウェル番号は、表1に記載の各ウェル番号に対応し、写真の下に記載はそのウェルに供された試料を示す。各試料名の下に記載は、「+」は16kDaの蛋白質が検出されたことを示し、「-」は検出されなかったことを示す。

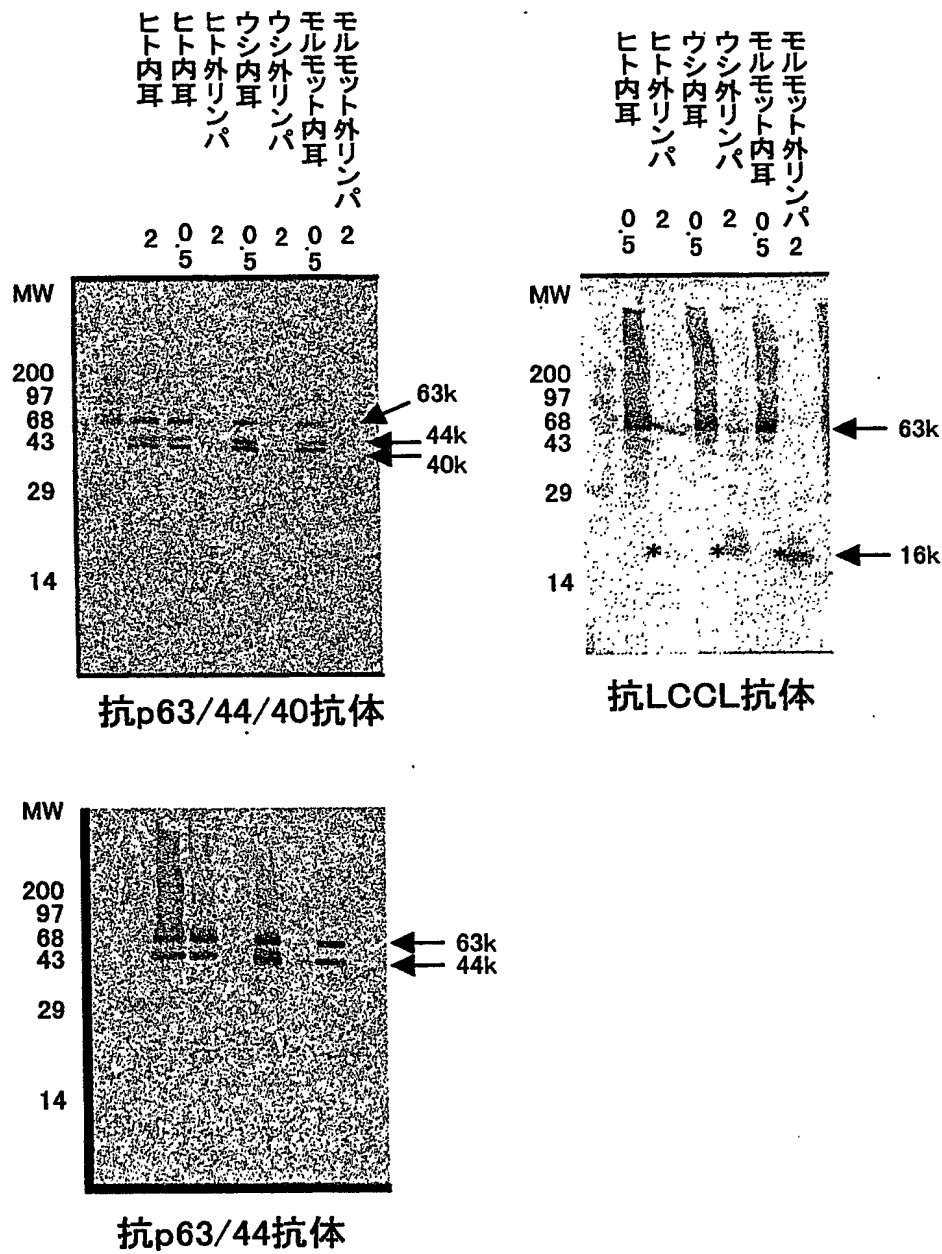
【図4】

図4は、ヒト由来の各種試料を、抗LCCL抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した結果を示す。図中、25～36のウェル番号は、表1に記載の各ウェル番号に対応し、写真の下に記載はそのウェルに供された試料を示す。各試料名の下に記載は、「+」は16kDaの蛋白質が検出されたことを示し、「-」は検出されなかったことを示す。上の写真は化学発光法による検出の際に1時間フィルムに感光させた場合の結果を示し、下の写真は同じニトロセルロース膜を10秒間感光させた場合の結果を示す。

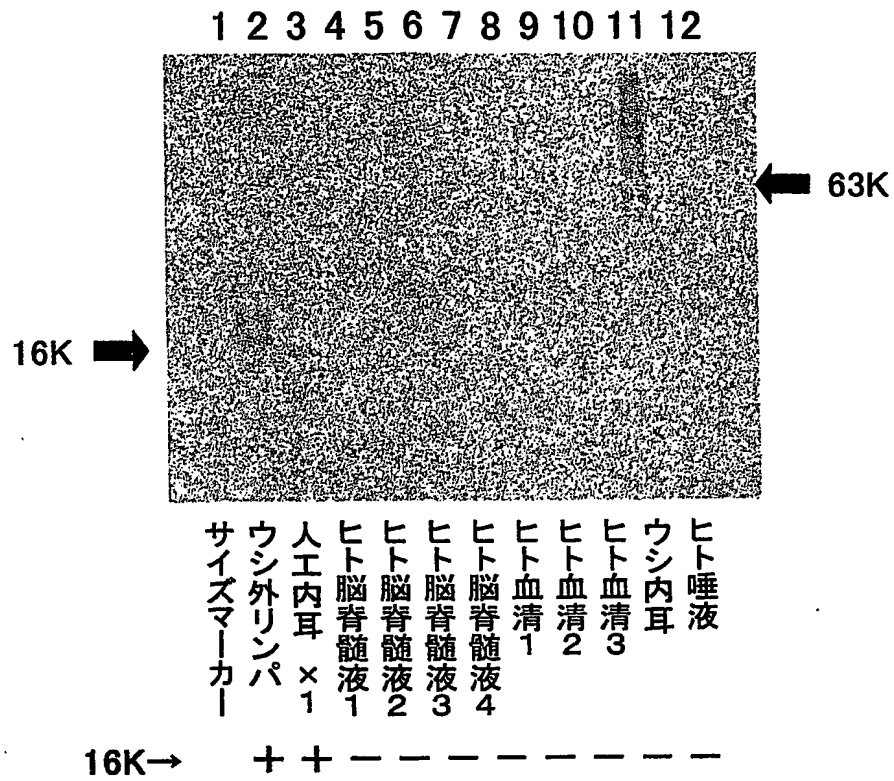
【書類名】

図面

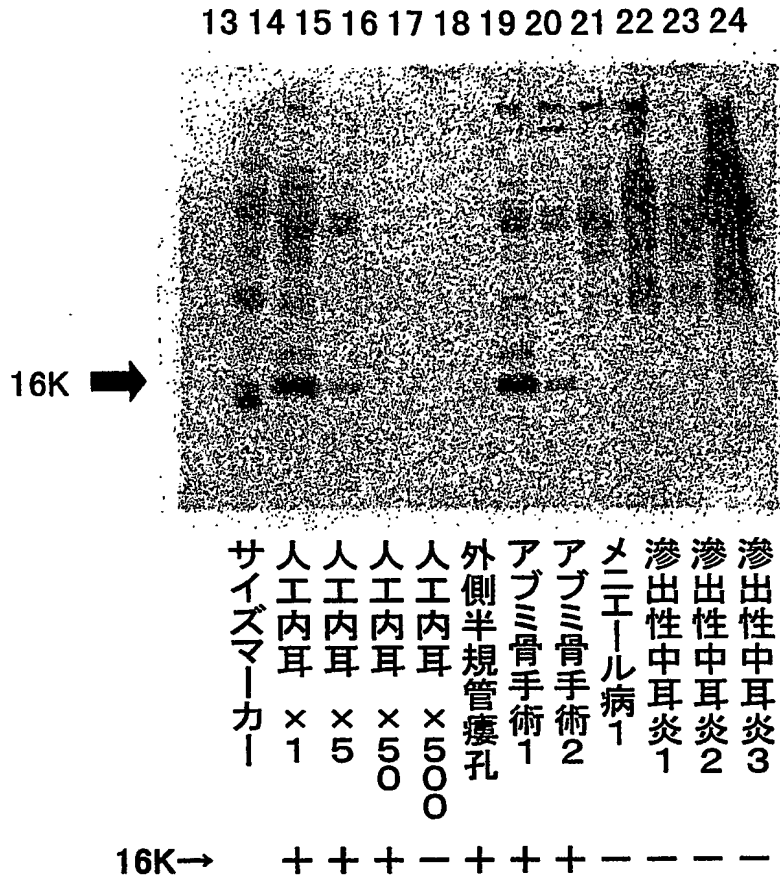
【図 1】



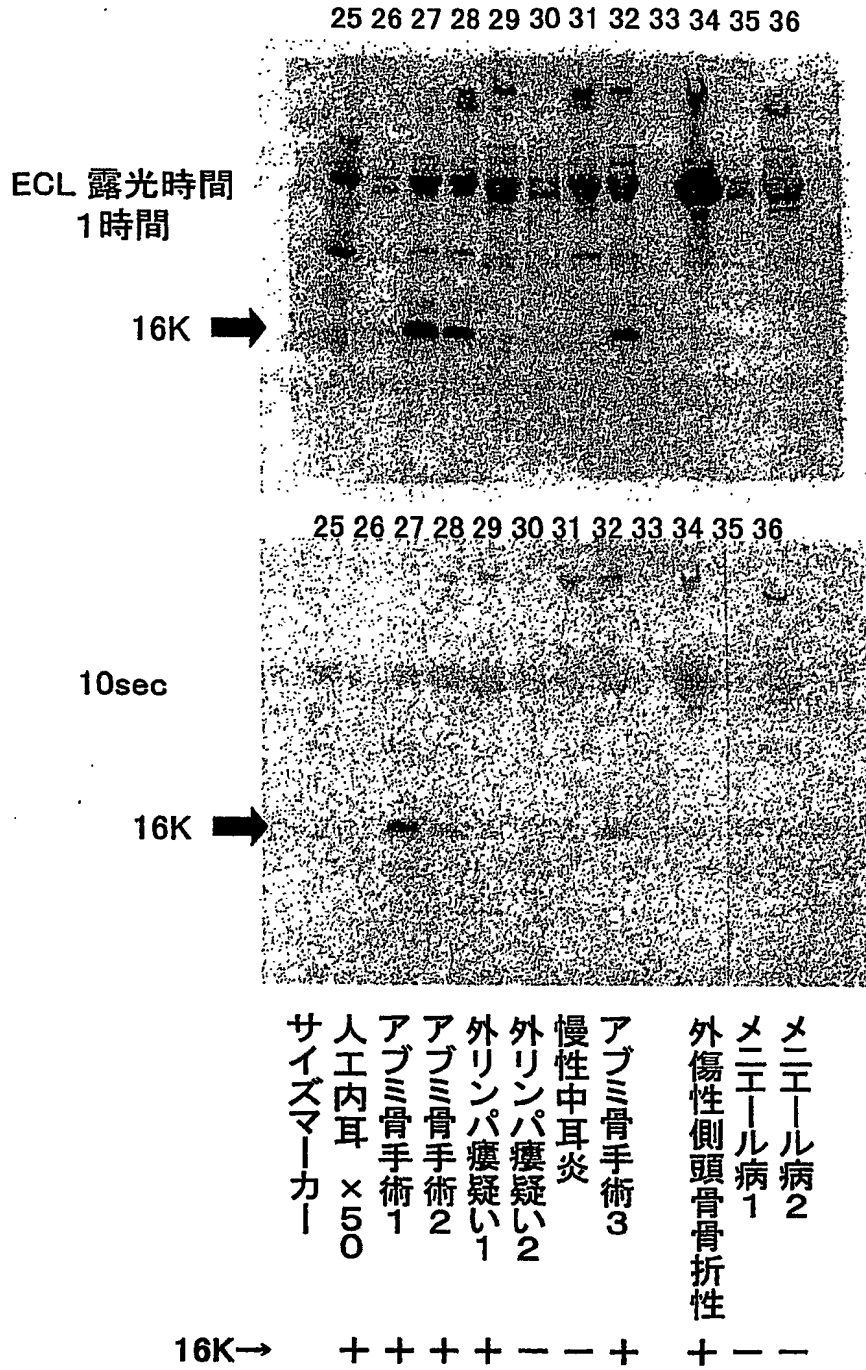
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡便、確実に、かつ患者への侵襲度の低い外リンパ瘻の検出方法を提供すること。

【解決手段】 中耳に存在する体液中のCochlinの存在を検出することを含む、外リンパ瘻の検出方法。

【選択図】 なし

特願 2002-187479

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[500557048]

1. 変更年月日

2000年10月30日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区千駄木1-1-5

氏 名

学校法人日本医科大学

特願 2002-187479

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005968]

1. 変更年月日

1994年10月20日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

氏 名

三菱化学株式会社